

APPLICATION UNDER UNITED STATES PATENT LAWS

Atty. Dkt. No. PM 258100
(M#)

Invention: NEUE FUR DAS TAL-GEN CODIERENDE NUKLEOTIDSEQUENZEN

Inventor (s): L. K. DUNICAN (Deceased)
Ashling MCCORMACK
Cliona STAPELTON
Kevin BURKE
Bettina MÖCKEL

Pillsbury Madison & Sutro LLP
Intellectual Property Group
1100 New York Avenue, NW
Ninth Floor
Washington, DC 20005-3918
Attorneys
Telephone: (202) 861-3000

65-31267-322696

This is a:

- Provisional Application
- Regular Utility Application
- Continuing Application
- PCT National Phase Application
- Design Application
- Reissue Application
- Plant Application
- Substitute Specification
Sub. Spec Filed
in App. No. / _____

SPECIFICATION

Neue für das tal-Gen codierende Nukleotidsequenzen

1. Background of the Invention

Gegenstand der Erfindung sind für das tal-Gen kodierende Nukleotidsequenzen und Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, L-

5 Threonin, L-Isoleucin und L-Tryptophan unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen das tal-Gen verstkt wird.

2. Background Information

Stand der Technik

Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der

10 Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, insbesondere aber in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere

15 Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie z. B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z. B. die Zuckerkonzentration während der 20 Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch z. B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser

25 Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z. B. das Lysin-Analogon S-(2-Aminoethyl)-Cystein oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren
30 wie z. B. L-Lysin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung Aminosäure

produzierender Stämme von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Übersichtsartikel hierzu findet man unter anderem bei

5 Kinoshita ("Glutamic Acid Bacteria", in: *Biology of Industrial Microorganisms*, Demain and Solomon (Eds.), Benjamin Cummings, London, UK, 1985, 115-142), Hilliger (BioTec 2, 40-44 (1991)), Eggeling (Amino Acids 6:261-272 (1994)), Jetten und Sinskey (Critical Reviews in

10 Biotechnology 15, 73-103 (1995)) und Sahm et al. (Annals of the New York Academy of Science 782, 25-39 (1996)).

Die Bedeutung des Pentosephosphat-Zyklus' für die Biosynthese und Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, durch coryneformen Bakterien ist Gegenstand

15 zahlreicher Bemühungen der Fachwelt.

So berichten Oishi und Aida (Agricultural and Biological Chemistry 29, 83-89 (1965)) über den „hexosemonophosphate shunt“ von *Brevibacterium ammoniagenes*. Sugimoto und Shio

a (Agricultural and ^{Biological} Chemistry 51, 101-108 (1987))
20 berichten über die Regulation der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase in *Brevibacterium flavum*.

09234266 02200000

a

Summary of the Invention
Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin und L-Tryptophan bereitzustellen.

5
Beschreibung der Erfindung

Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin, in der pharmazeutischen Industrie und insbesondere in der Tierernährung Anwendung. Es besteht 10 daher ein allgemeines Interesse daran, neue verbesserte Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Base, sondern auch die Salze wie z. B. 15 Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit 20 einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% 25 identisch ist mit den Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 30 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) eine Nukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 3 oder
- 5 (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz 10 (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

- ein Polynukleotid gemäß Anspruch 4, enthaltend eine der 15 Nukleotidsequenzen wie in SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 3 dargestellt,
- ein Polynukleotid gemäß Anspruch 5, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID NO. 2 und SEQ ID NO. 4 dargestellt, enthält
- 20 ein Vektor, enthaltend das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, und als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die 25 erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID NO. 1 oder SEQ ID NO. 3 enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID NO. 1 oder

SEQ ID NO. 3 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um 5 cDNA in voller Länge zu isolieren, die für die Transaldolase codieren und solche cDNA oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des Transaldolase-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin 10 geeignet als Primer zur Herstellung von DNA von Genen, die für die Transaldolase codieren, durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz 15 besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

20 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, 25 die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 ein, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Transaldolase und 30 auch solche, die zu wenigstens 70 % identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders die zu wenigstens 90 % bis

Dokument 990228 BT

95 % Identität mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-
5 Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin und L-Tryptophan unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits eine Aminosäure produzieren, und in denen die für das tal-Gen codierenden Nukleotidsequenzen, verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

10 Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken
15 Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art
25 *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind die zum Beispiel
30 bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

5 *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539
 Corynebacterium melassecola ATCC17965
 Brevibacterium flavum ATCC14067
 Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
 Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Lysin produzierende Mutanten bzw.
Stämme, wie beispielsweise

10 *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709
 Brevibacterium flavum FERM-P 1708
 Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712 ..
 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 und
 Corynebacterium glutamicum DSM5715
 Corynebacterium glutamicum DM58-1
15 *Corynebacterium glutamicum* DSM12866.

und daraus hergestellte L-Threonin produzierende Mutanten
bzw. Stämme, wie beispielsweise

20 *Corynebacterium glutamicum* ATCC21649
 Brevibacterium flavum BB69
 Brevibacterium flavum DSM5399
 Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 269
 Brevibacterium lactofermentum TBB-10

und daraus hergestellte L-Isoleucin produzierende Mutanten
bzw. Stämme, wie beispielsweise

25 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14309
 Corynebacterium glutamicum ATCC 14310
 Corynebacterium glutamicum ATCC 14311
 Corynebacterium glutamicum ATCC 15168
 Corynebacterium ammoniagenes ATCC 6871

30 und daraus hergestellte L-Tryptophan produzierende Mutanten
 bzw. Stämme, wie beispielsweise

Corynebacterium glutamicum ATCC21850 und
Corynebacterium glutamicum KY9218 (pKW9901)

Den Erfindern gelang es, das neue, für die Transaldolase
(EC 2.2.1.2) kodierende tal-Gen von *C. glutamicum* zu
5 isolieren.

Zur Isolierung des tal-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *E. coli* angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und
10 Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das... Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory
15 Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die
20 mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326
25 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHC79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). O'Donohue (The Cloning and Molecular Analysis of Four Common Aromatic Amino Acid Biosynthetic Genes from *Corynebacterium glutamicum*. Ph.D.
30 Thesis, National University of Ireland, Galway, 1997) beschreibt die Klonierung von *C. glutamicum* Genen unter Verwendung des von Short et al. (Nucleic Acids Research, 16: 7583) beschriebenen λ Zap Expressionssystems. Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli*
35 können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences,

25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirsche eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der 5 Stamm DH5αmcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren 10 subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten 15 Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z. B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) dem FASTA-Algorithmus von Pearson und Lipman (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 20 85, 2444-2448 (1988)) oder dem BLAST-Algorithmus von Altschul et al. (Nature Genetics 6, 119-129 (1994)) untersucht und mit den in öffentlich zugänglichen Datenbanken vorhandenen Sequenzeinträgen verglichen werden. Öffentlich zugängliche Datenbanken für Nukleotidsequenzen 25 sind beispielsweise die der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland) oder die des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA).

Gegenstand der Erfindung ist die neue DNA-Sequenz aus 30 *C. glutamicum*, die den für das tal-Gen kodierenden DNA-Abschnitt enthält, dargestellt als SEQ ID NO 1 und SEQ ID NO 3. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet.

In SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 4 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des Tal-Genproduktes dargestellt.

Eine auf die oben beschriebene Art und Weise hergestellte Genbank kann weiterhin durch Hybridisierung mit

5 Nukleotidsonden bekannter Sequenz wie beispielsweise des
zwf-Gens (JP-A-09224661) untersucht werden. Die klonierte
DNA der Klone, die eine positive Reaktion bei der
Hybridisierung zeigen, wird wiederum sequenziert und man
erhält zum einen die bekannte Nukleotidsequenz der
10 eingesetzten Sonde und zum anderen die benachbart liegenden
neuen DNA-Sequenzen.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 3 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 3 oder Teilen von oder SEQ ID NO 3 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z. B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in

20 Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d. h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen
25 oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 30 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit oder SEQ ID NO 3 oder Teilen von oder SEQ ID NO 3 hybridisieren,

Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus oder SEQ ID NO 3 ergeben.

5 Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter

10 Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 15 findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

20 Die Erfinder fanden heraus, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des tal-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die 25 Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im 30 Verlaufe der fermentativen L-Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des 35 Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit

unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

5 Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns 10 et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of 15 Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides 20 (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Beispielhaft wurde das erfindungsgemäße tal-Gen mit Hilfe von Plasmiden überexprimiert.

Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen 25 Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den 30 kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z. B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet 35 werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and

5 Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 15 269:32678-84; US-A 5,487,993), PCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der

20 Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.

25 Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"- Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Ein Beispiel für einen Plasmidvektor mit dessen Hilfe das Verfahren Amplifikation durch Integration durchgeführt werden kann ist pSUZ1, der in Figur 1 dargestellt ist. Plasmid pSUZ1 besteht aus dem von Spratt et al. (Gene 41:

337-342 (1986)) beschriebenem E. coli Vektor pBGS8 in den das tal-Gen eingebaut wurde.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, vorteilhaft sein, neben dem tal-Gen eines oder mehrere

5 Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Pentosephosphatweges oder des Aminosäure-Exports zu verstärken oder zu überexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung L-Aminosäuren, insbesondere von L-Lysin, gleichzeitig eines oder mehrere

10 der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

◦ das für die Dihydridipicolinat-Synthase kodierende dapA-Gen (EP-B 0 197 335),

◦ das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende lysC-Gen (Kalinowski et al. (1990), Molecular 15 and General Genetics 224: 317-324),

◦ das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

◦ das für die Pyruvat Carboxylase codierende pyc-Gen (DE-A-20 198 31 609),

◦ das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),

◦ das für die Transketolase kodierende tkt-Gen (Accession 25 number AB023377 der Datenbank der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland)),

◦ das für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase kodierende gnd-Gen (JP-A-9-224662),

◦ das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende zwf-Gen (JP-A-9-224661),

- das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen (DE-A-195 48 222),
- das zwal-Gen (DE 199 59 328.0; DSM 13115),
- das für die Enolase kodierende eno-Gen (DE: 19947791.4),

5 • das devB-Gen,

- das opcA-Gen (DSM 13264)

verstärkt, bevorzugt überexprimiert werden.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Threonin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus
10 der Gruppe

- gleichzeitig das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende hom-Gen (Peoples et al., Molecular Microbiology 2, 63-72 (1988)) oder das für eine "feed back resistente" Homoserin-Dehydrogenase kodierende hom^{dr}-Allel (Archer et al., Gene 107, 53-59 (1991)),
- das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Pyruvat Carboxylase codierende pyc-Gen (DE-A-198 31 609),
- das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- das für die Transketolase kodierende tkt-Gen (Accession number AB023377 der Datenbank der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland)),

- das für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase kodierende gnd-Gen (JP-A-9-224662),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende zwf-Gen (JP-A-9-224661),
- 5 ◦ das für den Threonin-Export kodierende thrE-Gen (DE 199 41 478.5; DSM 12840),
- das zwal-Gen (DE 199 59 328.0; DSM 13115),
- das für die Enolase kodierende eno-Gen (DE: 19947791.4),
- das devB-Gen,
- 10 ◦ das opca-Gen (DSM 13264)

verstärkt, bevorzugt überexprimiert werden..

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des tal-Gens gleichzeitig

- 15 ◦ das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase codierende pck-Gen (DE 199 50 409.1 DSM 13047) und/oder
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende pgi-Gen (US 09/396,478, DSM 12969), oder
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen
- 20 (DE 199 51 975.7; DSM 13114), oder
- das zwa2-Gen (DE: 199 59 327.2; DSM 13113)

abzuschwächen.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des tal-Gens

25 unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in:

Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder

die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle 5 Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise 10 während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur 15 Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen 20 aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L- 25 Aminosäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et 30 al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Folgender Mikroorganismus wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- *Escherichia coli* JM109/pSUZ1 als DSM 13263.

In SEQ ID NO 1 ist ebenfalls das neue devB-Gen enthalten.
Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen
Herstellung von Aminosäuren.

00000000000000000000000000000000

Folgende Figuren sind beigefügt:

Figur 1: Karte des Plasmids pSUZ1

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

5	lacZ:	segments of lacZ α gene fragment
	kan r:	kanamycin resistance
	tal:	transaldolase gene
	ori:	origin of replication of plasmid pBGS8
	BclI:	cut site of restriction enzyme BclI
10	EcoRI:	cut site of restriction enzyme EcoRI
	HindIII:	cut site of restriction enzyme HindIII
	PstI:	cut site of restriction enzyme PstI
	SacI:	cut site of restriction enzyme SacI

090228 265 - 03220600

Examples

The following examples will further illustrate this invention. The molecular biology techniques, e.g. plasmid DNA isolation, restriction enzyme treatment, ligations, 5 standard transformations of *Escherichia coli* etc. used are, (unless stated otherwise), described by Sambrook et al., (*Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (1989) Cold Spring Harbour Laboratories, USA).

10 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomal DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, *Plasmid* 33:168-179) 15 beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, 20 Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 25 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem 30 Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der

Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, 5 La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt. Zur Infektion des *E. coli* Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der 10 Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 µg/ml Ampicillin 15 ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektiert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des tal-Gens

20 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit 25 shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung 30 der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany). Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning

Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den

5 Sequenzervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde

10 anschließend in den *E. coli* Stamm DH5αMCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 µg/ml Zeocin ausplattiert.

15 Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467)

20 mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und

25 Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

30 Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte

35 Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:3389-3402), gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID NO 1 und SEQ ID NO 3 dargestellt.

Example 3

10 Cloning of the tal gene

PCR was used to amplify DNA fragments containing the entire tal gene of *C. glutamicum* 13032 and flanking upstream and downstream regions. PCR reactions were carried out using oligonucleotide primers designed from the sequence as determined in examples 1 and 2. Genomic DNA was isolated from *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 according to Heery and Dunican (Applied and Environmental Microbiology 59: 791-799 (1993)) and used as template. The tal primers used were:

20 fwd. primer: 5' GGT ACA AAG GGT CTT AAG 3'C
rev. primer: 5' GAT TTC ATG TCG CCG TTA 3'

PCR Parameters were as follows:

35 cycles
95°C for 3 minutes
25 94°C for 1 minute
47°C for 1 minute
72°C for 45 seconds
2.0 mM MgCl₂
approximately 150-200 ng DNA template.

30 The PCR product obtained was cloned into the commercially available pGEM-T vector purchased from Promega Corp. (pGEM-

T Easy Vector System 1, cat. no. A1360, Promega UK, Southampton, UK) using strain *E. coli* JM109 (Yanisch-Perron et al., Gene, 33: 103-119 (1985)) as a host. The entire tal gene was subsequently isolated from the pGEM T-vector on an 5 Eco RI fragment and cloned into the lacZ α EcoRI site of the *E. coli* vector pBGS8 (Spratt et al., Gene 41(2-3): 337-342 (1986)). The restriction enzymes used were obtained from Boehringer Mannheim UK Ltd. (Bell Lane, Lewes East Sussex BN7 1LG, UK) and used according to manufacturers 10 instructions. *E. coli* JM109 was then transformed with this ligation mixture and electrotransformants were selected on Luria agar supplemented with isopropyl-thiogalactopyranoside (IPTG), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-galactopyranoside (XGAL) and kanamycin at concentrations of 15 1mM, 0.02% and 50 mg/l respectively. Plates were incubated for twelve hours at 37°C. Plasmid DNA was isolated from one transformant, characterised by restriction enzyme analysis using Eco RI. This new construct was designated pSUZ 1.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> National University of Ireland, Galway
5 Degussa-Hüls AG

<120> Neue für das tal Gen codierende Nukleotidsequenzen

<130> 990228BT

10 <140>

<141>

<160> 4

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 6995

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (2471)..(3550)

25 <223> tal-Gen

<400> 1

cacatttgaa ccacagttgg ttataaaatg ggttcaacat cactatggtt agagggtttg 60

30 acgggtcaga ttaagcaaag actacttcg gggtagatca cctttgccaa atttgaacca 120

attaacctaa gtcgttagatc tgatcatcg atctaacgaa aacgaaccaa aactttggtc 180

ccgggttaac ccaggaagga ttgaccacct tgacgctgtc acctgaactt caggcgctca 240

ctgtacgcaa ttaccctct gattggtcg atgtggacac caaggctgta gacactgttc 300

gtgtcctcgc tgcagacgct gttagaaact gtggctccgg ccacccaggc accgcaatga 360

gcctggctcc cttgcatac accttgtaa agcgggttat gaacgttagat ccacaggaca 420

ccaaactgggc aggccgtgac cgcttcgttc tttcttgtgg ccactcctct ttgacccagt 480

acatccagct ttacttgggt ggattcggcc ttgagatgga tgacctgaag gctctgcgca 540

cctgggattc cttgacccca ggacaccctg agtaccgcca caccaagggc gttgagatca 600

ccactggccc tcttggccag ggtcttgcat ctgcagttgg tatggccatg gctgctcgtc 660

50 gtgagcgtgg cctattcgac ccaaccgctg ctgagggcga atccccattc gaccaccaca 720

tctacgtcat tgcttctgat ggtgacctgc aggaagggtgt cacctctgag gcatcctcca 780

tcgctggcac ccagcagctg ggcaacctca tcgtgttctg ggatgacaac cgcatctcca 840

tcgaagacaa cactgagatc gctttcaacg aggacgttgt tgctcggtac aaggcttacg 900

gctggcagac cattgaggtt gaggctggcg aggacgttgt agcaatcgaa gctgcagtgg 960

ctgaggctaa gaaggacacc aagcgaccta cttcatccg cgttcgacc atcatcgct 1020
 tccagctcc aactatgatg aacaccggtg ctgtcacgg tgctgcttt ggccgagctg 1080
 5 aggttgcagc aaccaagact gagcttggat tcgatcctga ggctcacttc gcatcgacg 1140
 atgaggttat cgctcacacc cgctccctcg cagagcgcgc tgcacagaag aaggctgcat 1200
 10 ggcaggtaa gttcgatgag tggcagctg ccaaccctga gaacaaggct ctgttcgatc 1260
 gcctgaactc ccgtgagctt ccagcgggct acgctgacga gctccaaaca tggatgcag 1320
 atgagaaggg cgtcgcaact cgttaaggctt ccgaggctgc acttcaggca ctggcaaga 1380
 15 cccttcctga gctgtgggc gttccgctg acctcgagg ttccaaacaac accgtgatca 1440
 agggctcccc ttccctcggc cctgagtcctt tctccaccga gacctggct gctgagcctt 1500
 20 acggccgtaa cctgcacttc ggtatccgtg agcacgctat gggatccatc ctcaacggca 1560
 tttccctcca cggtggcacc cgcccatacg gcggAACCTT cctcatcttc tccactaca 1620
 tgcgtcctgc agttcgatctt gcagctctca tggagaccga cgcttactac gtctggaccc 1680
 25 acgactccat cggctctggc gaagatggcc caacccacca gcctgttcaa accttggctg 1740
 cactgcgcgc catcccaggat ctgtccgtcc tgcgtcctgc agatgcgaac gagaccgccc 1800
 30 aggcttggc tgcagcactt gagtacaagg aaggccctaa gggcttgca ctgacccgccc 1860
 agaacgttcc tggcttggaa ggcaccaagg agaaggctgc tgaaggcggtt cgccgcgggt 1920
 gctacgtcctt ggttgggggt tccaaggaaa cccagatgt gatcctcatg ggctccggct 1980
 35 ccgaggttca gttcgagtt aacgctgca aggctctgga agctgagggc gttcgagctc 2040
 gcgttgttcc gttcccttgc atggattgggt tccaggagca ggacgcagag tacatcgagt 2100
 40 ccgttctgcc tgcagctgtg accgctcgat tgcgttgc agctggcattc gcaatgcctt 2160
 ggtaccgctt cttggcacc cagggccgtg ctgtccctt tgagcacttc ggtgcttctg 2220
 cgattacca gaccctgttt gagaagttcg gatcaccac cgtgcagtc gtggcagcgg 2280
 45 ccaaggactc cattaacggt taattggcct gctgtttta gttcaaccc gggcaatat 2340
 gattctccgg aattttattt ccccggttg ttgtttaa tcggtacaaa gggcttaag 2400
 cacatccctt acttgccgtc tcccttgcg cacagttcaa gaacaattct tttaaggaaa 2460
 50 atttagtttc atg tct cac att gat gat ctt gca cag ctc ggc act tcc 2509
 Met Ser His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser
 1 5 10
 55 act tgg ctc gac gac ctc tcc cgc gag cgc att act tcc ggc aat ctc 2557
 Thr Trp Leu Asp Asp Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu
 15 20 25

30	agc cag gtt att gag gaa aag tct gta gtc ggt gtc acc acc aac cca	2605
	Ser Gln Val Ile Glu Glu Lys Ser Val Val Gly Val Thr Thr Asn Pro	
35	35	40
45		45
5	gct att ttc gca gca gca atg tcc aag ggc gat tcc tac gac gct cag	2653
	Ala Ile Phe Ala Ala Ala Met Ser Lys Gly Asp Ser Tyr Asp Ala Gln	
50	55	60
10	atc gca gag ctc aag gcc gct ggc gca tct gtt gac cag gct gtt tac	2701
	Ile Ala Glu Leu Lys Ala Ala Gly Ala Ser Val Asp Gln Ala Val Tyr	
65	70	75
15	gcc atg agc atc gac gac gtt cgc aat gct tgt gat ctg ttc acc ggc	2749
	Ala Met Ser Ile Asp Asp Val Arg Asn Ala Cys Asp Leu Phe Thr Gly	
80	85	90
20	atc ttc gag tcc tcc aac ggc tac gac ggc cgc gtg tcc atc gag gtt	2797
	Ile Phe Glu Ser Ser Asn Gly Tyr Asp Gly Arg Val Ser Ile Glu Val	
95	100	105
25	gac cca cgt atc tct gct gac cgc gac gca acc ctg gct cag gcc aag	2845
	Asp Pro Arg Ile Ser Ala Asp Arg Asp Ala Thr Leu Ala Gln Ala Lys	
110	115	120
125		
30	gag ctg tgg gca aag gtt gat cgt cca aac gtc atg atc aag atc cct	2893
	Glu Leu Trp Ala Lys Val Asp Arg Pro Asn Val Met Ile Lys Ile Pro	
130	135	140
35	gca acc cca ggt tct ttg cca gca atc acc gac gct ttg gct gag ggc	2941
	Ala Thr Pro Gly Ser Leu Pro Ala Ile Thr Asp Ala Leu Ala Glu Gly	
145	150	155
40	atc agc gtt aac gtc acc ttg atc ttc tcc gtt gct cgc tac cgc gag	2989
	Ile Ser Val Asn Val Thr Leu Ile Phe Ser Val Ala Arg Tyr Arg Glu	
160	165	170
45	gtc atc gct gcg ttc atc gag ggc atc aag cag gct gct gca aac ggc	3037
	Val Ile Ala Ala Phe Ile Glu Gly Ile Lys Gln Ala Ala Ala Asn Gly	
175	180	185
50	cac gac gtc tcc aag atc cac tct gtg gct tcc ttc gtc tcc cgc	3085
	His Asp Val Ser Lys Ile His Ser Val Ala Ser Phe Phe Val Ser Arg	
190	195	200
205		
55	gtc gac gtt gag atc gac aag cgc ctc gag gca atc gga tcc gat gag	3133
	Val Asp Val Glu Ile Asp Lys Arg Leu Glu Ala Ile Gly Ser Asp Glu	
210	215	220
60	gct ttg gct ctg cgc ggc aag gca ggc gtt gcc aac gct cag cgc gct	3181
	Ala Leu Ala Leu Arg Gly Lys Ala Gly Val Ala Asn Ala Gln Arg Ala	
225	230	235
65	tac gct gtg tac aag gag ctt ttc gac gcc ggc gag ctg cct gaa ggt	3229
	Tyr Ala Val Tyr Lys Glu Leu Phe Asp Ala Ala Glu Leu Pro Glu Gly	
240	245	250
70	gcc aac act cag cgc cca ctg tgg gca tcc acc ggc gtg aag aac cct	3277
	Ala Asn Thr Gln Arg Pro Leu Trp Ala Ser Thr Gly Val Lys Asn Pro	
255	260	265

5	gct tac gct gca act ctt tac gtt tcc gag ctg gct ggt cca aac acc Ala Tyr Ala Ala Thr Leu Tyr Val Ser Glu Leu Ala Gly Pro Asn Thr 270 275 280 285	3325
10	gtc aac acc atg cca gaa ggc acc atc gac gct gtt ctg gag cag ggc Val Asn Thr Met Pro Glu Gly Thr Ile Asp Ala Val Leu Glu Gln Gly 290 295 300	3373
15	aac ctg cac ggt gac acc ctg tcc aac tcc gct gca gaa gct gac gct Asn Leu His Gly Asp Thr Leu Ser Asn Ser Ala Ala Glu Ala Asp Ala 305 310 315	3421
20	gtg ttc tcc cag ctt gag gct ctg ggc gtt gac ttg gca gat gtc ttc Val Phe Ser Gln Leu Glu Ala Leu Gly Val Asp Leu Ala Asp Val Phe 320 325 330	3469
25	cag gtc ctg gag acc gag ggt gtg gac aag ttc gtt gct tct tgg agc... Gln Val Leu Glu Thr Glu Val Asp Lys Phe Val Ala Ser Trp Ser 335 340 345	3517
30	gaa ctg ctt gag tcc atg gaa gct cgc ctg aag tagaatcagc acgctgcata Glu Leu Leu Glu Ser Met Glu Ala Arg Leu Lys 350 355 360	3570
35	agtaacggcg acatgaaatc gaatttagttc gatcttatgt ggccgttaca catctttcat taaagaaaagg atcgtgacac taccatcgtg agcacaaaca cgacccctc cagctggaca ctagcaaacc gcggattgct gccccagga ttctcggttgg tagttacgg ccggcgcaaa tggtccaaag aagactttga aaaatacgtt cgcgtatgcc caagtgttgg tgctcgtagc gaattccgtg aaaatgttttggagcgccctc gcccgggtt tggaaatttgt tcgcggcaac 40	3630 3690 3750 3810 3870 3930 3990 4050 4110 4170 4230 4290 4350 4410 4470 4530 4590
45	tttgcgtatg atgcagctt cgacaaacctc gctgcaacac tcaagcgatcg cgcacaaacc cgccgcaccc cgccgcaactg ggcttactac ctgtccattc caccagattc cttcacagcg gtctgccacc agctggagcg ttccggcatg gctgaatcca ccgaagaagc atggcgccgc gtgatcatcg agaagcctt cggccacaac ctcgaatccg cacacgagct caaccagctg gtcaacgcag tcttccaga atcttctgtt ttccgcattc accactattt gggcaaggaa 50	4050 4110 4170 4230 4290 4350 4410 4470 4530 4590
55	acagttcaaa acatcctggc tctgcgttt gctaaccagc tgtttgcgtt actgtggaaac tccaactacg ttgaccacgt ccagatcacc atggctgaag atattggctt gggcgttgcgt gctggttact acgacggcat cggcgccat cgcgtatcc caaccatggaa ctcttggctc tgggttgcgtt ggaagaacca atttcttgc tggccatcgca gctgcaggca gaaaagatca aggtgttgcgttcc tgcgtatcc cattggataa aacccctccgtt 55	4350 4410 4470 4530 4590

cggtggcagt acgctgccgg ttggcagggc tctgagttag tcaaggact tcgcgaagaa 4650
gatggcttca accctgagtc caccactgag acttttgcgg cttgtacctt agagatcacg 4710
5 tctcgctcgct gggctgggtgt gccgttctac ctgcgcacccg gtaagcgtct tggtcgcccgt 4770
gttactgaga ttgcccgtggt gtttaaagac gcaccacacc agccttcga cggcgacatg 4830
10 actgtatccc ttggccaaaa cgccatcgta attcgcgtgc agcctgatga aggtgtgctc 4890
atccgcttcg gttccaaggt tccaggttct gccatggaag tccgtgacgt caacatggac 4950
ttctcctact cagaatcctt cactgaagaa tcacctaag catacgacg cctcattttg 5010
15 gatgcgctgt tagatgaatc cagcctcttc cctaccaacg aggaagtggaa actgagctgg 5070
aagattctgg atccaattct tgaagcatgg gatgccgatg gagaaccaga ggattaccca 5130
20 gcgggtacgt ggggtccaaa gagcgctgtat gaaatgcttt cccgcaacgg tcacacctgg 5190
cgcaaggccat aatttagggg caaaaaatga tctttaact tccggataacc accacccagc 5250
aaatttccaa gaccctaact cgactgcgtg aatcgggcac ccaggtcacc accggccgag 5310
25 tgctcaccct catcggtgtc actgactccg aaagcgatgt cgctgcagtt accgagtcca 5370
ccaatgaagc ctcgcgcgag caccatctc gcgtgatcat tttgggtggtt ggcataaaaa 5430
30 ctgcagaaaa caaagttgac gcagaagtcc gtatcggtgg cgacgctggt gctccgaga 5490
tgatcatcat gcatctcaac ggacctgtcg ctgacaagct ccagtatgtc gtcacaccac 5550
tggcgttcc tgacaccccc atcggttgc ttggccagg tgaatcacca aagaatcctt 5610
35 cccaggaccc aattggacgc atcgacacaac gacgcatcac tgatgctttg tacgaccgtg 5670
atgacgcact agaagatcgt gttgagaact atcaccagg tgataccgac atgacgtggg 5730
40 cgccgccttac ccagtggcgg ggacttggc ctccttcatt ggatcaccca ccacacagcg 5790
aaatcaacttc cgtgaggctg accggtgcaa gcggcagtac ctcggtgat ttggctgcag 5850
gctgggtggc gcggaggctg aaagtgcctg tgatccgcga ggtgacagat gctcccaccc 5910
45 tgccaaccga tgagttgggt actccactgc tggctatcca ggcgcctggag atcggtcgca 5970
ccaccggctc gatcatcatc accatctatg acgctcatac cttcaggtt gatggtcc 6030
50 aatccggcaa tgccccatcg ctgggtggcta ttggctgcgtg aagtgagttcc gactgcttgt 6090
ctgaggagct tcgcccacatg gatccagatt tgggctacca gcacgcacta tccggcttgc 6150
ccagcgtcaa gctggaaacc gtctaaggag aaataacaaca ctatggttga tggtagtacgc 6210
55 gcacgcgata ctgaagattt ggttgcacag gctgcctcca aattcattga ggttggtaa 6270
gcagcaactg ccaataatgg caccgcacag gtagtgctca cgggtgggg cgccggcatc 6330
aagttgctgg aaaagctcag cgttgcgtgc gctgacccctg cctgggatcg cattcatgtg 6390

ttcttcggcg atgagcgcaa tgtccctgtc agtgattctg agtccaatga gggccaggct 6450
 cgtgaggcac tggtgtccaa ggtttctatc cctgaagcca acattcacgg atatggtctc 6510
 5 ggcgacgtag atcttgcaga ggcagccgc gcttacgaag ctgtgttgg a tgaattcgca 6570
 ccaaacggct ttgatcttca cctgctcggc atgggtggcg aaggccatat caactccctg 6630
 10 ttccctcaca ccgatgcagt caaggaatcc tccgcaaagg tcatcgccgt gtttgattcc 6690
 cctaaggcctc cttcagagcg tgcaactcta acccttcctg cggttcaactc cgcaaagcgc 6750
 gtgtggttgc tggtttctgg tgccgagaag gctgaggcag ctgcggcgat cgtcaacgg 6810
 15 gagcctgctg ttgagtgcc tgcgtctgg gctaccggat ctgaggaaac ggtattgttc 6870
 ttggctgatg atgctgcagg aaatctctaa gcagcgccag ctctaacaag aagctttaac 6930
 20 aagaagctct aacgaaaagc actaacaaac taatccgggt gcgaaccttc atctgaatcg 6990
 atgga 6995

25 <210> 2
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

30 <400> 2
 Met Ser His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser Thr Trp Leu
 1 5 10 15

35 Asp Asp Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu Ser Gln Val
 20 25 30

Ile Glu Glu Lys Ser Val Val Gly Val Thr Thr Asn Pro Ala Ile Phe
 35 40 45

40 Ala Ala Ala Met Ser Lys Gly Asp Ser Tyr Asp Ala Gln Ile Ala Glu
 50 55 60

Leu Lys Ala Ala Gly Ala Ser Val Asp Gln Ala Val Tyr Ala Met Ser
 65 70 75 80

45 Ile Asp Asp Val Arg Asn Ala Cys Asp Leu Phe Thr Gly Ile Phe Glu
 85 90 95

50 Ser Ser Asn Gly Tyr Asp Gly Arg Val Ser Ile Glu Val Asp Pro Arg
 100 105 110

Ile Ser Ala Asp Arg Asp Ala Thr Leu Ala Gln Ala Lys Glu Leu Trp
 115 120 125

55 Ala Lys Val Asp Arg Pro Asn Val Met Ile Lys Ile Pro Ala Thr Pro
 130 135 140

Gly Ser Leu Pro Ala Ile Thr Asp Ala Leu Ala Glu Gly Ile Ser Val
 145 150 155 160

Asn Val Thr Leu Ile Phe Ser Val Ala Arg Tyr Arg Glu Val Ile Ala
 165 170 175
 5 Ala Phe Ile Glu Gly Ile Lys Gln Ala Ala Ala Asn Gly His Asp Val
 180 185 190
 Ser Lys Ile His Ser Val Ala Ser Phe Phe Val Ser Arg Val Asp Val
 195 200 205
 10 Glu Ile Asp Lys Arg Leu Glu Ala Ile Gly Ser Asp Glu Ala Leu Ala
 210 215 220
 15 Leu Arg Gly Lys Ala Gly Val Ala Asn Ala Gln Arg Ala Tyr Ala Val
 225 230 235 240
 Tyr Lys Glu Leu Phe Asp Ala Ala Glu Leu Pro Glu Gly Ala Asn Thr
 245 250 255
 20 Gln Arg Pro Leu Trp Ala Ser Thr Gly Val Lys Asn Pro Ala Tyr Ala
 260 265 270
 Ala Thr Leu Tyr Val Ser Glu Leu Ala Gly Pro Asn Thr Val Asn Thr
 275 280 285
 25 Met Pro Glu Gly Thr Ile Asp Ala Val Leu Glu Gln Gly Asn Leu His
 290 295 300
 30 Gly Asp Thr Leu Ser Asn Ser Ala Ala Glu Ala Asp Ala Val Phe Ser
 305 310 315 320
 Gln Leu Glu Ala Leu Gly Val Asp Leu Ala Asp Val Phe Gln Val Leu
 325 330 335
 35 Glu Thr Glu Gly Val Asp Lys Phe Val Ala Ser Trp Ser Glu Leu Leu
 340 345 350
 Glu Ser Met Glu Ala Arg Leu Lys
 355 360
 40
 <210> 3
 <211> 1083
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <220>
 <221> CDS
 45 <222> (1)..(1080)
 <223> tal
 <400> 3
 50 atg tct cac att gat gat ctt gca cag ctc ggc act tcc act tgg ctc
 Met Ser His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser Thr Trp Leu
 55 1 5 10 15 48

gac	gac	ctc	tcc	cgc	gag	cgc	att	act	tcc	ggc	aat	ctc	agc	cag	gtt	96	
Asp	Asp	Leu	Ser	Arg	Glu	Arg	Ile	Thr	Ser	Gly	Asn	Leu	Ser	Gln	Val		
							20				25				30		
5	att	gag	gaa	aag	tct	gta	gtc	ggt	gtc	acc	acc	aac	cca	gct	att	ttc	144
	Ile	Glu	Lys	Ser	Val	Val	Gly	Val	Thr	Thr	Asn	Pro	Ala	Ile	Phe		
							35			40				45			
10	gca	gca	gca	atg	tcc	aag	ggc	gat	tcc	tac	gac	gct	cag	atc	gca	gag	192
	Ala	Ala	Ala	Met	Ser	Lys	Gly	Asp	Ser	Tyr	Asp	Ala	Gln	Ile	Ala	Glu	
							50			55				60			
15	ctc	aag	gcc	gct	ggc	gca	tct	gtt	gac	cag	gct	gtt	tac	gcc	atg	agc	240
	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Ala	Ser	Val	Asp	Gln	Ala	Val	Tyr	Ala	Met	Ser	
							65			70				75		80	
20	atc	gac	gac	gtt	cgc	aat	gct	tgt	gat	ctg	ttc	acc	ggc	atc	ttc	gag	288
	Ile	Asp	Asp	Val	Arg	Asn	Ala	Cys	Asp	Leu	Phe	Thr	Gly	Ile	Phe	Glu	
							85			90				95			
25	tcc	tcc	aac	ggc	tac	gac	ggc	cgc	gtg	tcc	atc	gag	gtt	gac	cca	cgt	336
	Ser	Ser	Asn	Gly	Tyr	Asp	Gly	Arg	Val	Ser	Ile	Glu	Val	Asp	Pro	Arg	
							100			105				110			
30	atc	tct	gct	gac	cgc	gac	gca	acc	ctg	gct	cag	gcc	aag	gag	ctg	tgg	384
	Ile	Ser	Ala	Asp	Arg	Asp	Ala	Thr	Leu	Ala	Gln	Ala	Lys	Glu	Leu	Trp	
							115			120				125			
35	gca	aag	gtt	gat	cgt	cca	aac	gtc	atg	atc	aag	atc	cct	gca	acc	cca	432
	Ala	Lys	Val	Asp	Arg	Pro	Asn	Val	Met	Ile	Lys	Ile	Pro	Ala	Thr	Pro	
							130			135				140			
40	ggt	tct	ttg	cca	gca	atc	acc	gac	gct	ttg	gct	gag	ggc	atc	agc	gtt	480
	Gly	Ser	Leu	Pro	Ala	Ile	Thr	Asp	Ala	Leu	Ala	Glu	Gly	Ile	Ser	Val	
							145			150				155		160	
45	aac	gtc	acc	ttg	atc	ttc	tcc	gtt	gct	cgc	tac	cgc	gag	gtc	atc	gct	528
	Asn	Val	Thr	Leu	Ile	Phe	Ser	Val	Ala	Arg	Tyr	Arg	Glu	Val	Ile	Ala	
							165			170				175			
50	gcg	ttc	atc	gag	ggc	atc	aag	cag	gct	gct	gca	aac	ggc	cac	gac	gtc	576
	Ala	Phe	Ile	Glu	Gly	Ile	Lys	Gln	Ala	Ala	Ala	Asn	Gly	His	Asp	Val	
							180			185				190			
55	tcc	aag	atc	cac	tct	gtg	gct	tcc	ttc	gtc	tcc	cgc	gtc	gac	gtt	624	
	Ser	Lys	Ile	His	Ser	Val	Ala	Ser	Phe	Phe	Val	Ser	Arg	Val	Asp	Val	
							195			200				205			
60	gag	atc	gac	aag	cgc	ctc	gag	gca	atc	gga	tcc	gat	gag	gct	ttg	gct	672
	Glu	Ile	Asp	Lys	Arg	Leu	Glu	Ala	Ile	Gly	Ser	Asp	Glu	Ala	Leu	Ala	
							210			215				220			
65	ctg	cgc	aag	gca	ggc	gtt	gcc	aac	gct	cag	cgc	gct	tac	gct	gtg	720	
	Leu	Arg	Gly	Lys	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Ala	Gln	Arg	Ala	Tyr	Ala	Val	
							225			230				235		240	
70	tac	aag	gag	ctt	ttc	gac	gcc	gag	ctg	cct	gaa	ggt	gcc	aac	act	768	
	Tyr	Lys	Glu	Leu	Phe	Asp	Ala	Ala	Glu	Leu	Pro	Glu	Gly	Ala	Asn	Thr	
							245			250				255			

5	cag cgc cca ctg tgg gca tcc acc ggc gtc aag aac cct gcg tac gct Gln Arg Pro Leu Trp Ala Ser Thr Gly Val Lys Asn Pro Ala Tyr Ala 260 265 270	816
10	gca act ctt tac gtt tcc gag ctg gct ggt cca aac acc gtc aac acc Ala Thr Leu Tyr Val Ser Glu Leu Ala Gly Pro Asn Thr Val Asn Thr 275 280 285	864
15	atg cca gaa ggc acc atc gac gcg gtt ctg gag cag ggc aac ctg cac Met Pro Glu Gly Thr Ile Asp Ala Val Leu Glu Gln Gly Asn Leu His 290 295 300	912
20	ggt gac acc ctg tcc aac tcc gcg gca gaa gct gac gct gtc ttc tcc Gly Asp Thr Leu Ser Asn Ser Ala Ala Glu Ala Asp Ala Val Phe Ser 305 310 315 320	960
25	cag ctt gag gct ctg ggc gtt gac ttg gca gat gtc ttc cag gtc ctg ... Gln Leu Glu Ala Leu Gly Val Asp Leu Ala Asp Val Phe Gln Val Leu 325 330 335	1008
30	gag acc gag ggt gtg gac aag ttc gtt gct tct tgg agc gaa ctg ctt Glu Thr Glu Gly Val Asp Lys Phe Val Ala Ser Trp Ser Glu Leu Leu 340 345 350	1056
35	gag tcc atg gaa gct cgc ctg aag tag Glu Ser Met Glu Ala Arg Leu Lys 355 360	1083
40	<210> 4 <211> 360 <212> PRT <213> Corynebacterium glutamicum	
45	<400> 4 Met Ser His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser Thr Trp Leu 1 5 10 15	
50	Asp Asp Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu Ser Gln Val 20 25 30	
55	Ile Glu Glu Lys Ser Val Val Gly Val Thr Thr Asn Pro Ala Ile Phe 35 40 45	
60	Ala Ala Ala Met Ser Lys Gly Asp Ser Tyr Asp Ala Gln Ile Ala Glu 50 55 60	
65	Leu Lys Ala Ala Gly Ala Ser Val Asp Gln Ala Val Tyr Ala Met Ser 65 70 75 80	
70	Ile Asp Asp Val Arg Asn Ala Cys Asp Leu Phe Thr Gly Ile Phe Glu 85 90 95	
75	Ser Ser Asn Gly Tyr Asp Gly Arg Val Ser Ile Glu Val Asp Pro Arg 100 105 110	
80	Ile Ser Ala Asp Arg Asp Ala Thr Leu Ala Gln Ala Lys Glu Leu Trp 115 120 125	

Ala Lys Val Asp Arg Pro Asn Val Met Ile Lys Ile Pro Ala Thr Pro
 130 135 140

5 Gly Ser Leu Pro Ala Ile Thr Asp Ala Leu Ala Glu Gly Ile Ser Val
 145 150 155 160

Asn Val Thr Leu Ile Phe Ser Val Ala Arg Tyr Arg Glu Val Ile Ala
 165 170 175

10 Ala Phe Ile Glu Gly Ile Lys Gln Ala Ala Asn Gly His Asp Val
 180 185 190

Ser Lys Ile His Ser Val Ala Ser Phe Phe Val Ser Arg Val Asp Val
 195 200 205

Glu Ile Asp Lys Arg Leu Glu Ala Ile Gly Ser Asp Glu Ala Leu Ala
 210 215 220

20 Leu Arg Gly Lys Ala Gly Val Ala Asn Ala Gln Arg Ala Tyr Ala Val
 225 230 235 240

Tyr Lys Glu Leu Phe Asp Ala Ala Glu Leu Pro Glu Gly Ala Asn Thr
 245 250 255

25 Gln Arg Pro Leu Trp Ala Ser Thr Gly Val Lys Asn Pro Ala Tyr Ala
 260 265 270

Ala Thr Leu Tyr Val Ser Glu Leu Ala Gly Pro Asn Thr Val Asn Thr
 275 280 285

Met Pro Glu Gly Thr Ile Asp Ala Val Leu Glu Gln Gly Asn Leu His
 290 295 300

30 Gly Asp Thr Leu Ser Asn Ser Ala Ala Glu Ala Asp Ala Val Phe Ser
 305 310 315 320

Gln Leu Glu Ala Leu Gly Val Asp Leu Ala Asp Val Phe Gln Val Leu
 325 330 335

40 Glu Thr Glu Gly Val Asp Lys Phe Val Ala Ser Trp Ser Glu Leu Leu
 340 345 350

45 Glu Ser Met Glu Ala Arg Leu Lys
 355 360

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit den Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4
 - 15 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenzen von a), b) oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1,
20 wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist, die zusätzlich zumindest eine der Nukleotidsequenzen enthält, die für die Gene tkt, zwf, opcA und devB codieren.
- 25 3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1,
wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2,
enthaltend eine der Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID NO. 3 dargestellt.
- 30 5. Polynukleotid gemäß Anspruch 2,
das für ein Polypeptid codiert, das die

Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID NO. 2 und SEQ ID NO. 4 dargestellt, enthält.

6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2 enthaltend

5 (i) eine Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID NO. 3
dargestellt, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die den Sequenzen
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Codes entspricht, oder

10 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zur den
Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen
hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

7. Als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die
einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß
15 Anspruch 1 trägt.

8. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren,
da durch gekennzeichnet,
daß man folgende Schritte durchführt:

20 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden Bakterien, in denen man zumindest
das tal-Gen und gegebenenfalls eines oder mehrere
der Gene tkt-Gen, zwf-Gen, devB-Gen oder opcA-Gen
gleichzeitig verstärkt,

25 b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium
oder in den Zellen der Bakterien, und

c) Isolieren der gewünschten L-Aminosäure.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8,
da durch gekennzeichnet,
daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich
30 weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten
L-Aminosäure verstärkt.

10. Verfahren gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Bakterien einsetzt, in denen die
Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet
sind, die die Bildung des der gewünschten L-Aminosäure
verringern.

11. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 8
bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß man coryneforme Bakterien verwendet, die eine der
Aminosäuren aus der Gruppe L-Lysin, L-Threonin, D-
Isoleucin oder L-Tryptophan herstellen.

12. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß man in den coryneformen Mikroorganismen, die
insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren,
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
aus der Gruppe

20 12.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende dapA-Gen,

12.2 das für eine feed back resistente
Aspartatkinase kodierende lysC-Gen,

25 12.3 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat
Dehydrogenase kodierende gap-Gen,

12.4 das für die Pyruvat-Carboxylase
kodierende pyc-Gen,

12.5 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase
kodierende mgo-Gen,

30 12.6 das für die Transketolase kodierende tkt-Gen,

12.7 das für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase kodierende gnd-Gen,

12.8 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende zwf-Gen,

5 12.9 das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen,

12.10 das zwal-Gen,

12.11 das für die Enolase kodierende eno-Gen,

12.12 das opcA-Gen

verstärkt bzw. überexprimiert.

10 13. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin gemäß Anspruch 8,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man in coryneformen Mikroorganismen, die insbesondere bereits L-Threonin produzieren,
15 gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

13.1 gleichzeitig das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende hom-Gen oder das für eine "feed back resistente" Homoserin-Dehydrogenase kodierende hom^{dr}-Allel,

20 13.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen,

13.3 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende pyc-Gen,

25 13.4 das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqa-Gen,

13.5 das für die Transketolase kodierende tkt-Gen,

13.6 das für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase kodierende gnd-Gen,

13.7 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende zwf-Gen,

5 13.8 das für den Threonin-Export kodierende thrE-Gen,

13.9 das zwal-Gen,

13.10 das für die Enolase kodierende eno-Gen,

13.11 das opcA-Gen

verstärkt, insbesondere überexprimiert.

10 14. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man für die Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere von L-Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin oder L-Tryptophan Bakterien fermentiert, in denen man

15 gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe,

14.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase codierende pck-Gen

14.2 das für die Glucose-6-Phosphat6 Isomerase codierende pgi-Gen

20 14.3 das für die Pyruvat-Oxidase codierende poxB-Gen oder

14.4 das zwa2-Gen

abschwächt.

25 15. Verwendung von Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1 als Hybridisierungssonden zur Isolation von cDNA, die für das tal-Genprodukt codiert.

16. Verwendung von Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1 als Hybridisierungssonden zur Isolierung von cDNA oder Genen, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des tal-Gens aufweisen.

Neue für das tal-Gen codierende Nukleotidsequenzen**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine

5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 enthält,

10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit den Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den

15 Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenzen von a), b) oder c)

und ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, 20 das dadurch gekennzeichnet ist, daß man folgende Schritte durchführt:

a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen man zumindest das tal-Gen verstärkt,

25 b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und

c) Isolieren der L-Aminosäure.

Figure 1:

DJS
3/5/03